



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

BACHARELADO EM BIOTECNOLOGIA

ERIC MARROCOS APPOLINARIO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LINHAGENS
DE *PSEUDOMONAS* ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMAS DE
RÃS.**

FORTALEZA

2023

Eric Marrocos Appolinario

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LINHAGENS
DE *PSEUDOMONAS* ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMAS DE RÃS.

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Ceará, como requisito final para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

FORTALEZA

2023

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

A659a Appolinario, Eric Marrocos.

Avaliação da atividade antimicrobiana de linhagens de *Pseudomonas* isoladas de ninhos de espumas de rãs. / Eric Marrocos Appolinario. – 2023.
39 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Curso de Biotecnologia, Fortaleza, 2023.

Orientação: Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa.

1. Montagem de genoma. 2. *Pseudomonas putida*. 3. Antifúngico. 4. Antibacteriano. 5. Anuros. I. Título.
CDD 661

Eric Marrocos Appolinario

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE LINHAGENS
DE *PSEUDOMONAS* ISOLADAS DE NINHOS DE ESPUMAS DE RÃS.

Monografia apresentada ao Curso de Biotecnologia
do Departamento de Bioquímica e Biologia
Molecular da Universidade Federal do Ceará, como
requisito final para obtenção do título de Bacharel
em Biotecnologia.

Aprovada em: 07/12/23.

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará

Dra. Mirella Leite Pereira
Universidade Federal do Ceará

Dra. Talita Camila Evaristo da Silva Nascimento
Universidade Federal do Ceará

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer à minha mãe **Sandra** e meu irmão **Daniel**, por sempre terem me apoiado nos estudos, somente por isso pude ter condições chegar até aqui. Sou muito grato por todo o suporte que me deram ao longo desses anos de estudos.

Preciso também agradecer à **Profa. Dra. Denise Cavalcante Hissa**, minha orientadora, através de quem pude realizar esse projeto. Graças à oportunidade que me deu, à sua paciência, compreensão e presença, fui capaz de iniciar efetivamente na microbiologia e na academia, após vários anos em casa por conta da pandemia, além de ter viabilizado a infraestrutura do LARGEN para o trabalho, onde fiz amigos maravilhosos e tive orientação e acompanhamento exemplar. Agradeço, também, à **Profa. Dra. Vânia Maria Maciel Melo** por disponibilizar a infraestrutura do LEMBIOTECH, que possibilitou a realização dos experimentos, além de ter construído uma grande equipe de trabalho, que me ajudou inúmeras vezes. Agradeço às **Dra. Mirella, Talita, Cristiane e Bella**, por terem me sanado dúvidas, oferecido sugestões e me orientado na execução de vários protocolos e experimentos. Também a todos os meus colegas de laboratório, em especial **Livia, Victor, Paulo, Bruno** e principalmente à **Vanessa**, pela amizade e nossos momentos juntos, além da paciência. Agradeço profundamente ao **Matheus Henrique** pelo auxílio nos procedimentos de bioinformática utilizados neste trabalho.

Devo também aos meus amigos do colégio e do início da graduação que permanecem, em especial **Bernardo, Isaac, Levi e Jochuan**. Além deles, a meus amigos à distância do Odisseia, que em muitos momentos ajudaram a descontraí, principalmente a **Suelen** e o **Carlos**. Também a minha gata **Bolota**, que me faz companhia em casa e ajuda a manter a mente no lugar. Novamente, sou muito grato a todos pelos momentos, conversas e memórias.

Por fim, agradeço imensamente à Universidade Federal do Ceará, meu estudo superior só foi viável graças à universidade pública. A todos os professores e colegas que participaram desses longos 5 anos de aprendizado, desenvolvimento e amadurecimento. Agradeço também ao **PIBIC-UFC** pela iniciação científica que tornou este trabalho ainda mais importante e valioso pra mim.

Resumo

Os anuros desenvolveram diversas táticas para se desenvolver e reproduzir. Uma delas são os ninhos de espumas, bioestruturas de composição rica e com uma microbiota própria, que protegem os ovos e onde vivem os girinos após sua eclosão. Os anuros, são animais de grande potencial biotecnológico, devido à sua capacidade de produzir biomoléculas antimicrobianas. Porém, as bactérias presentes no ninho foram pouco estudadas quanto à sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos eficientes e seu potencial para aplicação médica ou na agricultura. O gênero *Pseudomonas* é muito comum nesses ninhos, e tem alto potencial biotecnológico, com destaque para sua capacidade de produzir compostos antimicrobianos. O objetivo deste estudo foi o de avaliar o potencial antimicrobiano de linhagens de *Pseudomonas* isoladas dos ninhos de espumas das rãs *Leptodactylus vastus*, *Adenomera hylaedactyla* e *Phyllasaemus cuvieri*, do estado do Ceará, assim como analisar o genoma de uma das mais promissoras. Seis linhagens de *Pseudomonas* isoladas dos ninhos de espumas de rãs foram testadas contra os fungos filamentosos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, e duas foram testadas contra bactérias Gram positivas e Gram negativas patogênicas humanas, como *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*. A linhagem mais promissora no teste antifúngico teve seu genoma sequenciado, montado e anotado, onde foram procurados genes de interesse, como genes *housekeeping*, genes antifúngicos e genes relacionados à virulência e patogenicidade. Dentre as seis cepas trabalhadas, uma apresentou atividade antifúngica e duas apresentaram atividade antibacteriana. O estudo do genoma da cepa B8 possibilitou sua identificação molecular como *Pseudomonas putida* com base nos genes 16S rDNA, *gyrB* e *rpoB*. Dessa forma, as cepas de *Pseudomonas* de ninhos de espuma mostraram produção de compostos antimicrobianos, e abrem perspectivas para estudos futuros sobre suas características ecológicas e seu potencial biotecnológico.

Palavras-chave: Montagem de genoma; *Pseudomonas putida*; Antifúngico; Antibacteriano; Anuros.

Abstract

Anurans have developed various tactics for growth and reproduction, one of which involves foam nests—biostructures of rich composition housing a distinctive microbiota that protects eggs and provides a habitat for tadpoles post-hatching. Anurans exhibit considerable biotechnological potential owing to their capacity to produce antimicrobial biomolecules. However, bacteria residing in these nests have been minimally explored concerning their efficacy in producing antimicrobial compounds and their potential applications in medicine or agriculture. The *Pseudomonas* genus is prevalent in these nests, showcasing high biotechnological potential, notably in the production of antimicrobial compounds. This study aimed to assess the antimicrobial potential of *Pseudomonas* strains isolated from foam nests of the frogs *Leptodactylus vastus*, *Adenomera hylaedactyla*, and *Phyllasaemus cuvieri* in the state of Ceará. Additionally, the genomic analysis of one of the most promising strains was conducted. Six *Pseudomonas* strains isolated from frog foam nests were tested against phytopathogenic filamentous fungi *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. Two strains were assessed against Gram-positive and Gram-negative human pathogenic bacteria such as *Staphylococcus aureus* and *Salmonella enterica*. The most promising strain in the antifungal assay had its genome sequenced, assembled, and annotated, with a focus on identifying "housekeeping" genes, antifungal genes, and genes associated with virulence and pathogenicity. Among the six strains studied, one exhibited antifungal activity, and two displayed antibacterial activity. Genomic analysis of the B8 strain identified it as *Pseudomonas putida* based on 16S rDNA, *gyrB*, and *rpoB* genes. Thus, *Pseudomonas* strains from foam nests demonstrated antimicrobial compound production, providing avenues for future investigations into their ecological characteristics and biotechnological potential.

Keywords: Genome assembly; *Pseudomonas putida*; Antifungal; Antibacterial; Anurans.

Resumen

Los anuros han desarrollado diversas tácticas para crecer y reproducirse, y una de ellas involucra nidos de espuma, bioestructuras de rica composición con una microbiota propia que protege los huevos y sirve como hábitat para las renacuajos después de la eclosión. Los anuros exhiben un considerable potencial biotecnológico debido a su capacidad para producir biomoléculas antimicrobianas. Sin embargo, las bacterias presentes en estos nidos han sido poco exploradas en cuanto a su eficacia para producir compuestos antimicrobianos y su potencial aplicación en medicina o agricultura. El género *Pseudomonas* es común en estos nidos y presenta un alto potencial biotecnológico, destacando su capacidad para producir compuestos antimicrobianos. Este estudio tuvo como objetivo evaluar el potencial antimicrobiano de cepas de *Pseudomonas* aisladas de los nidos de espuma de las ranas *Leptodactylus vastus*, *Adenomera hylaedactyla* y *Phyllasaemus cuvieri*, en el estado de Ceará. Además, se realizó un análisis genómico de una de las cepas más prometedoras. Seis cepas de *Pseudomonas* aisladas de los nidos de espuma de ranas fueron probadas contra hongos filamentosos fitopatógenos *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Dos cepas fueron evaluadas contra bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas para los humanos, como *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enterica*. La cepa más prometedora en la prueba antifúngica tuvo su genoma secuenciado, ensamblado y anotado, centrándose en la identificación de genes "housekeeping", genes antifúngicos y genes asociados a la virulencia y patogenicidad. De las seis cepas estudiadas, una mostró actividad antifúngica y dos presentaron actividad antibacteriana. El análisis genómico de la cepa B8 la identificó molecularmente como *Pseudomonas putida* basándose en los genes 16S rDNA, *gyrB* y *rpoB*. Así, las cepas de *Pseudomonas* de los nidos de espuma demostraron la producción de compuestos antimicrobianos, abriendo perspectivas para futuras investigaciones sobre sus características ecológicas y su potencial biotecnológico.

Palabras clave: Ensamblaje de genomas; *Pseudomonas putida*; Antifúngico; Antibacteriano; Anuros.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ninho de <i>Leptodactylus vastus</i>	15
Figura 2: Esquema de <i>Cross-Streaking</i>	22
Figura 3: Esquema de teste antifúngico.....	23
Figura 4: Ilustração das etapas de bioinformática.....	25
Figura 5: Inibição bactérias de teste pela linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp. P49.....	26
Figura 6: Inibição bactérias de teste pela linhagem de <i>Pseudomonas</i> sp. P119.....	27
Figura 7: Inibição dos fungos por <i>Pseudomonas</i> sp. B8.....	28
Figura 8: Relatório da quantidade de sequências brutas.....	30
Figura 9: Relatório da quantidade de sequências após sua filtragem.....	30
Figura 10: Relatório da qualidade geral dos dados após a montagem do genoma.....	31
Figura 11: Dados estatísticos da montagem do genoma de <i>Pseudomonas</i> sp. B8.....	31
Figura 12: Árvore filogenética de B8 montada com genes <i>housekeeping</i>	32
Figura 13: <i>Contigs</i> de B8 ordenados com genes de interesse anotados.....	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Ocorrência de anuros no estado do Ceará e sua importância científica.....	13
2.2	Ninhos de espuma e sua microbiota	15
2.3	A prospecção de biomoléculas antimicrobianas de origem bacteriana.	16
2.4	Os nichos ecológicos de <i>Pseudomonas</i> spp. e seu potencial antimicrobiano	17
2.5	O estudo do genoma bacteriano	18
3	OBJETIVOS.....	20
3.1	Objetivos Gerais	20
3.2	Objetivos Específicos	20
4	METODOLOGIA	21
4.1	Ativação do estoque de bactérias	21
4.2	Teste de atividade antibacteriana	21
4.3	Ativação do estoque de fungos	22
4.4	Teste de atividade antifúngica	22
4.5	Montagem e análise do genoma.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5.1	Testes em meio sólido.....	26
5.2	Identificação da cepa B8 e busca por genes de interesse.....	29
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Os anfíbios são um grupo de grande importância ambiental, pois participam do controle biológico de pragas e são indicadores sensíveis das condições de onde habitam (HOPKINS, 2007). Por conta de sua respiração majoritariamente cutânea, sua alta sensibilidade a substâncias tóxicas e sua baixa predação, quedas nas populações de anfíbios refletem, muitas vezes, distúrbios ambientais (ZAGHLOUL *et al.*, 2020).

Os anuros são o maior grupo de anfíbios, caracterizado por animais sem cauda, com pernas traseiras musculosas e cabeça e olhos avantajados, são os mais comuns dentre os anfíbios na maioria dos ecossistemas globais (WELLS, 2007). Grande parte dos anuros produz um ninho de espuma durante o amplexo, onde serão depositados seus ovos, e onde a fase larval deve se desenvolver na maior parte do tempo, até sofrer metamorfose. Essas estruturas biológicas protegem os ovos e girinos da exposição solar e ressecamento, além de servir como abrigo e fonte de alimento e oxigênio para as larvas em desenvolvimento, graças à sua composição diversa de proteínas surfactantes, sacarídeos e lectinas (SHAHKUDIN *et al.*, 2017; HISSA *et al.*, 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010).

Além da sua composição bioquímica, os ninhos de espumas de anfíbios possuem uma comunidade microbiana nativa que ainda é pouco estudada (HISSA *et al.*, 2008; MCGRATH-BLASER, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2023). Nesse contexto, é de suma importância o conhecimento a respeito da biodiversidade da microbiota dos ninhos de espuma de anuros, pois, essa comunidade bacteriana pode variar de acordo com a espécie que produz o ninho e com o ambiente em que é depositado (MONTEIRO *et al.*, 2023). Um dos vários gêneros bacterianos encontrados nos ninhos de espumas é *Pseudomonas*. Essas bactérias são conhecidas por sua capacidade de produzir compostos eficientes no combate de patógenos, além de atuarem como promotoras de crescimento vegetal e na degradação de compostos tóxicos ao ambiente (HERNÁNDEZ-LEÓN *et al.*, 2015; WEIMER *et al.*, 2020).

A produção de biomoléculas por bactérias isoladas de amostras naturais é estudada há décadas, já que as elas são fontes muito promissoras de biomoléculas com as mais diversas aplicações biotecnológicas, como compostos com atividade antimicrobiana, são muito valiosos para a agricultura e medicina, visto que microrganismos podem desenvolver resistência aos pesticidas e fármacos mais comumente utilizados, além de causar potenciais danos colaterais ao meio ambiente e aos indivíduos (COHEN; TARTASKY, 1997; RANI *et al.*, 2020).

Em estudos prévios do nosso grupo de pesquisa, no Laboratório de Recursos Genéticos (LARGEN), a microbiota de ninhos de espumas de rãs do estado do ceará, como *Leptodactylus vastus*, *Adenomera hylaedactyla* e *Phyllasaemus cuvieri*, foi isolada. Um dos gêneros bacterianos mais abundantes é *Pseudomonas*. Espécies desse gênero são conhecidas por seu potencial biotecnológico e pela produção de compostos antimicrobianos. Partindo desse princípio, nosso grupo se perguntou: Será que as linhagens de *Pseudomonas* presentes nos ninhos de espumas de rãs são capazes de produzir compostos que inibem o crescimento de microrganismos patogênicos?

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Ocorrência de anuros no estado do Ceará e sua importância científica

Os anfíbios existem em praticamente todos os ambientes, exceto os oceanos, regiões isoladas e inóspitas ou de frio extremo. No Brasil esses animais podem ser encontrados em inúmeros ecossistemas, inclusive no semiárido brasileiro. O estado do Ceará abriga uma rica diversidade de anuros, representados por sapos, pererecas e rãs (WELLS, 2007; MONTEIRO, *et al.*, 2023).

As características climáticas distintas da região, que incluem áreas semiáridas e de baixa altitude, bem como ecossistemas mais úmidos e elevados, como serras, permitindo a existência de populações com diferentes características adaptativas. Apesar do clima seco, a presença de diferentes habitats, como lagoas temporárias, cachoeiras e riachos sazonais, contribui para a adaptação desses anfíbios às condições locais (ARZABE, 1999; VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008).

A adaptabilidade dos anuros às condições climáticas desafiadoras em ambientes semiáridos é evidente em suas estratégias reprodutivas. Em resposta às secas sazonais, algumas espécies desenvolveram estratégias reprodutivas como a reprodução em poças temporárias. Essa adaptação permite a reprodução eficaz quando a água está disponível, otimizando suas chances de sobrevivência. Além disso, apresentam adaptações fisiológicas para a economia de água nos processos metabólicos, e de adaptações no estilo de vida, para que permaneçam mais tempo ociosos, gastando o mínimo possível de energia (VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008; NAVAS; ANTONIAZZI; JARED, 2004; HISSA *et al.*, 2016).

A família de anuros mais comum no estado do Ceará é Leptodactylidae. Essa família apresenta uma adaptabilidade reprodutiva considerável, como a produção de ninhos de espumas e a reprodução grupal, que facilita sua prosperidade no ambiente quente e seco da Caatinga (VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008). Apesar da baixa disponibilidade de água, essa região abriga uma diversidade desses animais, que podem abrigar áreas urbanas, serras, mangues e o próprio semiárido do Sertão. Algumas das espécies de rãs produtoras de ninhos de espuma encontradas no Ceará são: *Adenomera hylaedactyla*, *Phyllasaemus cuvieri* e *Leptodactylus vastus* (MONTEIRO *et al.*, 2023).

Os ninhos de cada espécie podem diferir em tamanho, consistência, durabilidade e no substrato em que são depositados. Essas bioestruturas mostram ser uma maneira eficaz de contornar as altas temperaturas, a insolação e a estiagem, visto que em muitas regiões do

semiárido não existem corpos d'água perenes para que os girinos se desenvolvam de maneira adequada (FISCHER, 2023; VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008).

Os anfíbios destacam-se como organismos promissores em várias áreas de pesquisa. Além da sua função de manter a hegemonia nas cadeias alimentares e no controle de pragas dos ambientes que vivem, eles também atuam como possíveis bioindicadores de mudanças climáticas, visto sua respiração majoritariamente cutânea lhes confere alta sensibilidade para perturbações no ambiente (HOPKINS, 2007; HOCKING; BABBITT, 2014).

Por outro viés, os anuros são representativos na busca por biomoléculas com aplicações na saúde humana. Muitos desses animais secretam venenos na pele para se defender de predadores e ameaças, e essas substâncias podem apresentar caráter alucinógeno e anestésico. Entretanto, muitos povos originários de regiões de florestas tropicais utilizam substâncias secretadas da pele ou da glândula paratóide desses animais para tratar doenças leves ou para combater envenenamento, mostrando o potencial dos anuros para uso médico (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017).

Algumas espécies de sapos produzem compostos esteróides capazes de combater células cancerígenas. A bufalina é um exemplo muito conhecido de biomolécula indutora de apoptose e inibidora de neoplasia obtida a partir de sapos. Essa substância é muito conhecida pela medicina tradicional chinesa, e vem sendo estudada por potencialmente inibir o crescimento de tumores no endométrio e ovários (RODRÍGUEZ *et al.*, 2017; SOUMOY *et al.*, 2022).

As brevininas são peptídeos muito conhecidos, e que podem ser encontrados na pele de inúmeros anuros, eles são capazes de inibir o crescimento de bactérias. Outros peptídeos, como magaininas, apresentam caráter antiviral, sendo, inclusive, eficientes no combate ao SARS-COV2 (MORIKAWA; HAGIWARA; NAKAJIMA, 1992; AMARAL; IENES-LIMA, 2022). Alguns desses peptídeos também são eficientes no combate a fungos de interesse médico. A temporina G mostrou inibição satisfatória das leveduras *Candida albicans* e o *Cryptococcus neoformans*, dois dos principais patógenos fúngicos encontradas em humanos imunossuprimidos, comprovando a eficiência antifúngica de secreções da pele dos anuros (D'AURIA *et al.*, 2022).

Além de ser eficiente em leveduras patogênicas humanas, as moléculas bioativas da pele dos sapos também são eficientes contra fungos filamentosos de interesse da agricultura. Extratos metanólicos da secreção cutânea de sapos da família Bufonidae mostraram ser

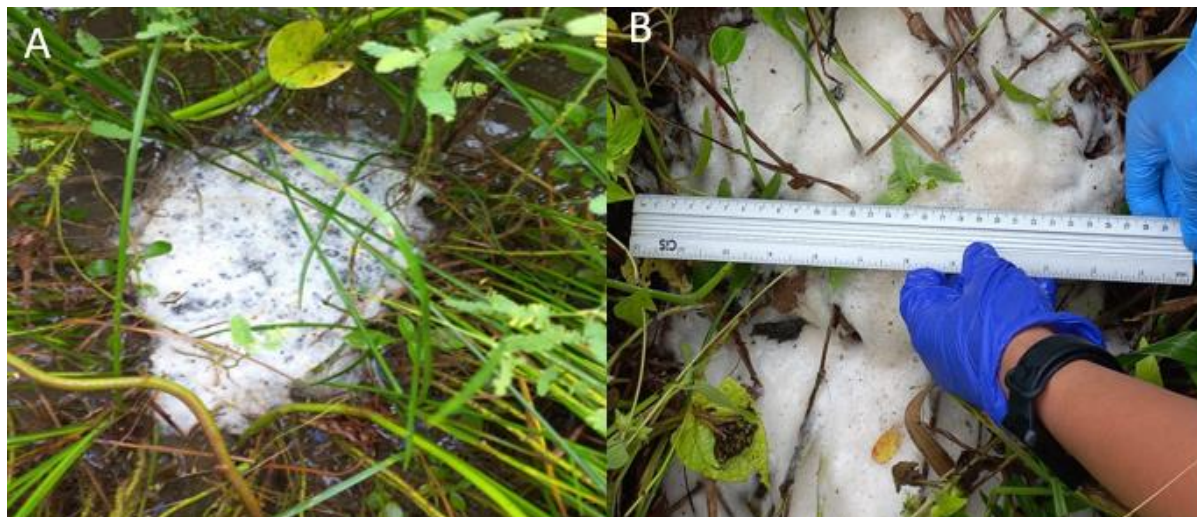
eficientes na inibição de fungos fitopatogênicos comuns, como dos gêneros *Fusarium* e *Rhizoctonia* (RAASCH-FERNANDES *et al.*, 2021).

2.2 Ninhos de espuma e sua microbiota

Muitas espécies da família Leptodactylidae, que inclui *L. vastus*, *A. hylaedactyla* e *P. cuvieri*, se reproduzem através de ninhos de espuma (MONTEIRO *et al.*, 2023). Estes são formados no ato da reprodução de anuros, o amplexo. A fêmea libera fluidos proteicos pela cloaca, e deposita os ovos. Enquanto isso, o macho movimenta as pernas em um movimento circular repetitivo, misturando as secreções e formando a espuma, além de fertilizar alguns dos ovos, que deverão eclodir, e a fase larval pode permanecer no ninho até completar seu desenvolvimento. (HISSA *et al.*, 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010).

Diversos ambientes servem como locais comuns para a deposição de ninhos de espuma. Os Leptodactylidae constroem ninhos na superfície de corpos d'água, mas também podem depositar esses ninhos em tocas que escavam no solo e suspensos na vegetação ou cobertos por ela. Esses ninhos terrestres podem ser observados no bioma da Caatinga (**Figura 1**), principalmente devido à baixa disponibilidade de água e escassez de chuvas (VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008).

Figura 1: (A) Ninho de *Leptodactylus vastus* encontrado e coletado no Campus do Pici; (B) Escala de tamanho



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os ninhos têm certa durabilidade no ambiente, e permite que os girinos resistam ao ressecamento e às altas temperaturas durante períodos de baixa precipitação e possam completar sua metamorfose naquele ambiente (VIEIRA; SANTANA; ARZABE, 2008; DALGETTY & KENNEDY, 2010; HISSA *et al.*, 2016). Eles são essenciais para a manutenção da

biodiversidade, visto que protegem os ovos e girinos contra predadores e danos climáticos. Essas estruturas também podem atuar na regulação de temperatura e oxigênio disponível. (HISSA *et al.*, 2008; MÉNDEZ-NARVÁEZ *et al.*, 2015; DALGETTY & KENNEDY, 2010).

A espuma que compõe os ninhos é muito rica em proteínas surfactantes, carboidratos e lectinas (FLEMING, 2009; HISSA *et al.*, 2016; DANQUAH *et al.*, 2022), e possui uma comunidade microbiana própria (HISSA *et al.*, 2008), que ainda é pouco estudado em relação à composição bioquímica do ninho. Num estudo recente, o microbioma de ninhos de rãs de três espécies do Ceará, *Leptodactylus vastus*, *Adenomera hylaedactyla* e *Phyllasaemus cuvieri*, foi avaliado, e comparado com o de amostras de solo adjacente e da pele de indivíduos adultos. O estudo mostra que a microbiota do ninho difere consideravelmente dessas amostras, todavia, o gênero *Pseudomonas* foi encontrado em todas essas amostras (MONTEIRO *et al.*, 2023).

2.3 A prospecção de biomoléculas antimicrobianas de origem bacteriana.

As bactérias, podem produzir uma grande variedade de moléculas bioativas com atividade antimicrobiana. A adaptação constante das bactérias em ambientes competitivos as possibilitou desenvolver uma gama diversificada de compostos para combater ameaças, incluindo outros microrganismos. Essas moléculas bioativas incluem peptídeos, enzimas, lipídios e metabólitos secundários (DANQUAH *et al.*, 2022).

No viés da medicina, os microrganismos super-resistentes tornam-se cada vez mais comuns. O uso excessivo de coquetéis de antibióticos e antifúngicos em ambiente hospitalar causam, a longo prazo, a seleção de cepas resistentes desses microrganismos, possivelmente mais letais. Mesmo microrganismos simples e que podem ser encontrados no próprio corpo humano, como *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* podem ser extremamente letais em pacientes imunossuprimidos, graças à sua resistência adquirida pela exposição aos antifúngicos. Dessa forma, a caracterização de compostos bioativos antimicrobianos produzidos por bactérias é sempre desejada, a fim de contornar, ainda que temporariamente, esses problemas persistentes (CUI *et al.*, 2022; BATBYAL; KUNDU; BISWAS, 2012).

No viés da agricultura, as infecções por fungos filamentosos causam uma perda relevante da quantidade e qualidade dos alimentos produzidos (FISHER *et al.*, 2020). Graças à sua reprodução por esporos, esse tipo de fungo se espalha rapidamente e o comércio de vegetais por longas distâncias facilita essa dispersão (REIS; BOITEUX, 2007). Além disso, normalmente utilizam agrotóxicos para combater essas infecções. Contudo, os agrotóxicos são de natureza inespecífica e causam prejuízos à microbiota benéfica para os vegetais, além de

causarem contaminações ambientais a longo prazo, além de poderem induzir resistência nos fungos (DAISLEY *et al.*, 2022; SRIVASTAV, 2020).

Dessa forma, a exploração de bactérias isoladas de materiais ou organismos da natureza tem se revelado uma estratégia valiosa para descobrir e desenvolver moléculas antifúngicas promissoras, proporcionando benefícios para a conservação ambiental e favorecendo a biorremediação. Através de técnicas de triagem e identificação, é possível isolar de algum substrato natural microrganismos que demonstrem atividade antagonista desejável, que podem vir a ser utilizadas como base para novos produtos agrícolas (SUÁREZ-ESTRELLA *et al.*, 2007) ou medicamentos. Os ninhos de espumas de rãs são fonte de um microbioma muito diverso e ainda pouco estudado (MONTEIRO *et al.*, 2023), com destaque para a presença de *Pseudomonas* spp.

2.4 Os nichos ecológicos de *Pseudomonas* spp. e seu potencial antimicrobiano

As bactérias do gênero *Pseudomonas* são organismos ubíquos que desempenham papéis importantes em diversos ecossistemas, destacando-se por sua notável adaptabilidade e diversidade. Sua ecologia abrange desde solos até ambientes aquáticos, demonstrando uma capacidade única de colonizar uma ampla gama de substratos. Essa versatilidade é atribuída à sua capacidade de utilizar uma variedade de fontes de carbono e energia, resistir a condições adversas e estabelecer relações simbióticas ou mesmo patogênicas com plantas, animais e outros microrganismos (DOLAN *et al.*, 2020; RAIGER *et al.*, 2014; ZHAO; LIN, 2005).

Essas bactérias também se destacam por desempenharem papel significativo na promoção do crescimento vegetal, pois ao estabelecer interações benéficas com plantas, são capazes de controlar patógenos e induzir o crescimento de determinados tecidos vegetais, principalmente na rizosfera. Algumas espécies são reconhecidas por sua habilidade em solubilizar fosfato, fixar nitrogênio atmosférico e produzir hormônios vegetais, tais como auxinas, que estimulam o crescimento das plantas. Essas interações resultam em aumentos significativos na nutrição vegetal, promovendo o desenvolvimento radicular e a resistência a estresse (SUHANA; NUTAN; ANOOP, 2020; DAVID; CHANDRASEHAR; SELVAM, 2018; OTEINO *et al.*, 2015).

No contexto biotecnológico, o gênero *Pseudomonas* possui diversos organismos de interesse devido às suas propriedades metabólicas únicas. Muitas espécies são reconhecidas por sua habilidade em degradar compostos tóxicos, como hidrocarbonetos e pesticidas, apresentando potencial para biorremediação (GILANI *et al.*, 2015).

As bactérias do gênero *Pseudomonas* também apresentam potencial antifúngico notório. Essas espécies podem inibir o crescimento de fungos fitopatogênicos, possivelmente gerando implicações significativas na agricultura, na preservação de alimentos e na gestão de doenças relacionadas a fungos (WALSH; MORRISSEY; O’GARA, 2001).

Algumas cepas de *Pseudomonas* produzem compostos de caráter antifúngico, como lipopeptídeos cíclicos, pirrolnitrina e pioluterina, que desempenham papéis cruciais na supressão do crescimento fúngico. Além disso, certas bactérias desse gênero também são capazes de inibir o crescimento de outras bactérias, possivelmente patogênicas para plantas, ou mesmo humanos. Um composto de produção característica das *Pseudomonas* é a mupirocina, que mostra alta eficiência na inibição de bactérias específicas, particularmente *Staphylococcus aureus* (RAMETTE *et al.*, 2011; MATTHIJS *et al.*, 2014).

Ademais, a compreensão mais aprofundada dos mecanismos envolvidos na atividade antimicrobiana pelas *Pseudomonas* permitirá o desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle biológico e possivelmente o desenvolvimento de novos produtos para tratamento de espécies infectadas.

2.5 O estudo do genoma bacteriano

A identificação de genes responsáveis pela produção de compostos antimicrobianos e genes de virulência e patogenicidade de linhagens promissora faz-se necessário para delinear o potencial biotecnológico dessas linhagens e possíveis áreas de atuação biotecnológica.

As bactérias podem ser identificadas de várias formas. A observação da morfologia macro e microscópica, além de uma bateria de testes bioquímicos, como testes de motilidade, gelatina, citrato ou redução de nitrato pode ser aplicada. Bactérias muito conhecidas, como *Pseudomonas aeruginosa*, podem ser identificadas por esse método, já que suas características já são estudadas a décadas (CHAUHAN; JINDAL, 2020).

Contudo, uma forma mais eficiente e rápida para a identificação de bactérias é através da identificação molecular, que envolve a extração do DNA, seguido de uma PCR para amplificar genes de interesse, com o auxílio de primers específicos. Dentre esses genes, o mais comum de se analisar para bactérias é o gene 16S para RNA ribossomal. Esse gene é adequado para isso, pois tem como características a baixa recombinação e transferência horizontal, e a alta conservação e especificidade por espécie. Existem outros genes, que podem variar a depender da bactéria que se espera que a cepa seja, como o ITS1 ou o rpoD, para o gênero

Pseudomonas, utilizando primers de alta especificidade. Apesar desse método ser mais eficiente e preciso do que os testes bioquímicos, não oferece muitas informações sobre o metabolismo dessas bactérias (MULET, 2009; CHAUHAN; JINDAL, 2020).

Portanto, a forma mais completa e precisa para se identificar e conhecer uma cepa bacteriana é através do sequenciamento total do genoma, seguido da montagem deste. O Sequenciamento de Nova Geração (NGS), como o método Illumina MiSeq, que é muito utilizado para o sequenciamento do DNA de muitas bactérias simultaneamente.

Dessa maneira, o estudo do potencial antagonista de cepas de *Pseudomonas* isoladas dos ninhos de espumas de anuros é desejável, visto que essas bactérias podem ser eficientes na inibição de espécies que causam prejuízos para a agricultura e afetem a saúde humana. Esse potencial biotecnológico é relevante, pois pode ocasionar em futuras melhorias, como o desenvolvimento de novos fármacos e estratégias de biorremediação.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar o potencial antagonista de bactérias *Pseudomonas* isoladas de ninhos de espumas das rãs de *Leptodactylus vastus*, *Phyllasaemus cuvieri* e *Adenomera hylaedactyla* contra espécies de fungos fitopatogênicos filamentosos e bactérias de interesse médico, bem como caracterizar a cepa mais promissora quanto à sua identificação molecular e pesquisar a presença de genes antifúngicos através da montagem de seu genoma.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial antibacteriano de duas cepas de *Pseudomonas* spp. contra *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*.
- Avaliar o potencial antifúngico de seis cepas de *Pseudomonas* spp. contra *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia Solani*.
- Realizar a montagem do genoma de uma cepa de *Pseudomonas*.
- Buscar genes de interesse biotecnológico em uma cepa de *Pseudomonas*.

4 METODOLOGIA

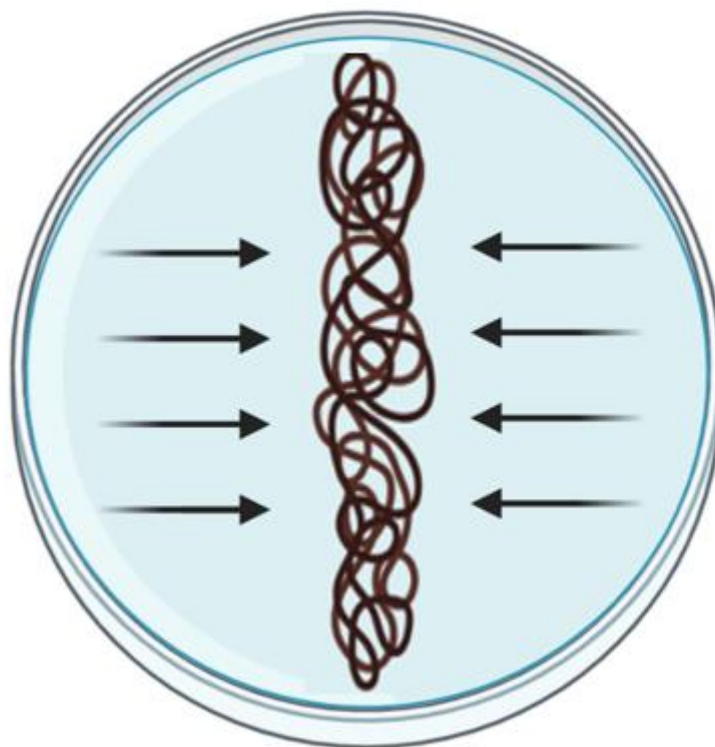
4.1 Ativação do estoque de bactérias

Todas as cepas de *Pseudomonas* manipuladas já haviam sido previamente isoladas dos ninhos de espumas de rãs (CASTRO, 2019; MARTINS, 2020), enquanto as espécies testadas eram comerciais. Todas estavam estocadas em freezer -80 °C, no Laboratório de Recursos Genéticos (Largen), do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. As culturas foram ativadas em caldo TGE (triptona 5 g/L, glicose 1 g/L e extrato de levedura 2,5 g/L). Os inóculos então foram submetidos à incubação em 35°C e sob agitação 150 rpm por 18h. No dia seguinte ao inóculo em caldo, as seis cepas de *Pseudomonas* utilizadas neste estudo (P49, P94, P119, P137, L91 e B8), assim como as bactérias para teste oriundas de estoque (*Escherichia coli*; *Bacillus subtilis*; *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica*) foram transferidas para meio sólido ATGE (TGE adicionado de ágar 1,5%) que haviam sido preparadas anteriormente, e incubadas em estufa a 35 °C por 24 h.

4.2 Teste de atividade antibacteriana

Para avaliar a capacidade antibacteriana das cepas de *Pseudomonas* selecionadas, foi utilizado um método de *Cross-Streaking* em meio Ágar Mueller-Hinton. Esse método consiste em inocular, numa única estria vertical no centro da placa, uma bactéria em fase log. Essa bactéria foi incubada por 48 h, a fim de alcançar sua fase estacionária, e liberar no meio o máximo possível de compostos secundários. Então, foram inoculadas, em estrias horizontais e espelhadas, as demais bactérias do teste, e incubadas por 48 h, monitorando a dinâmica do crescimento das colônias e avaliando se há inibição, facilitação, ou crescimento natural. Foram testadas as cepas P119 e P49 contra as *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus* e *S. enterica* simultaneamente. Todas as culturas bacterianas foram inoculadas em meio líquido TGE. As culturas tiveram sua densidade óptica (DO) padronizada, durante a fase log, em 0,1 a 600nm em um espectrofotômetro, utilizando o meio TGE como branco (**Figura 2**).

Figura 2.



Fonte: Elaborado pelo autor. Esquema retratando a disposição dos inóculos de diferentes culturas bacterianas numa mesma placa, para o teste de inibição por *cross-streaking*.

4.3 Ativação do estoque de fungos

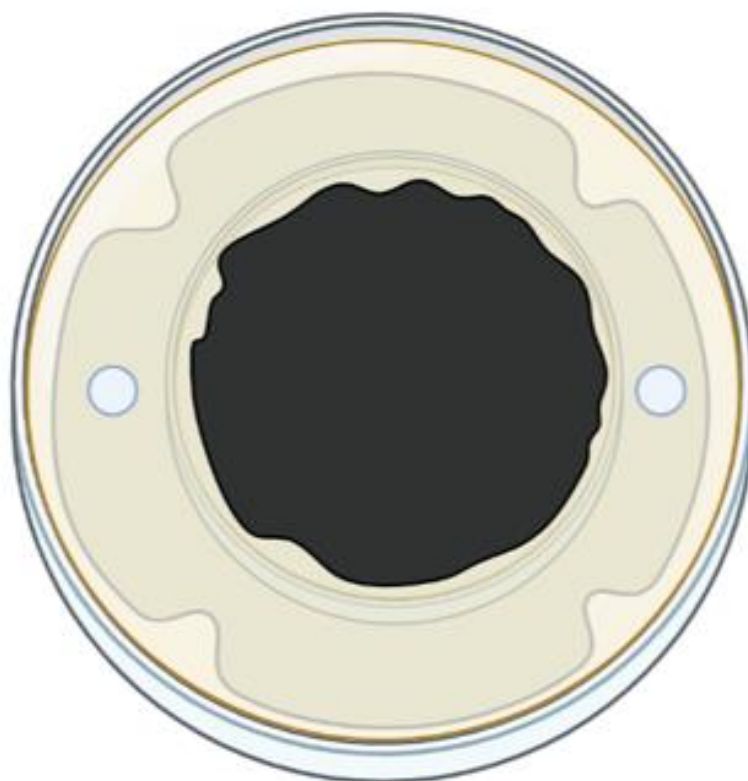
Os fungos filamentosos fitopatogênicos utilizados foram *Fusarium oxysporum* e *Rhizoctonia solani*, que pertencem à Coleção de fungos do Lembiotech e estão preservados pelo método Castellani. Para a reativação, os fungos foram inoculados em frascos tipo Erlenmeyer, de volume total 125mL, contendo 25 mL de caldo Sabouraud (dextrose 40 g/L e peptona 20 g/L) com pH 5,6 e a 30 °C sob agitação de 150 rpm por 72h. Posteriormente, foram inoculados em placas com meio Ágar Sabouraud (Sabouraud adicionado de Ágar 2%, para fornecer rigidez ao substrato para o crescimento fúngico), e incubadas na temperatura de 30 °C, por sete dias.

4.4 Teste de atividade antifúngica

Para avaliar a produção de compostos antifúngicos, foi utilizado o método de antagonismo, em meio BDA (dextrose 20 g/L, extrato de batata 4 g/L, ágar 2%). As seis cepas de *Pseudomonas* (P49, P94, P119, P137, L91 e B8) foram utilizadas neste teste. Foram empregados os fungos *F. oxysporum* e *R. solani*. Esporos de cada fungo foram transferidos das placas com Ágar Sabouraud para o centro de uma placa com meio sólido BDA, e incubados

por 30 °C por 96 h. Após esse período, as colônias de *Pseudomonas* foram inoculadas em duplicata próximo da borda das placas, além de *E. coli*, que foi inoculada em duplicata nas bordas opostas, como controle negativo. As bactérias tiveram sua DO padronizada para 1,0 a 600nm, num espectrofotômetro. O ensaio foi observado por sete dias, a fim de avaliar se houve ou não inibição (**Figura 3**).

Figura 3.



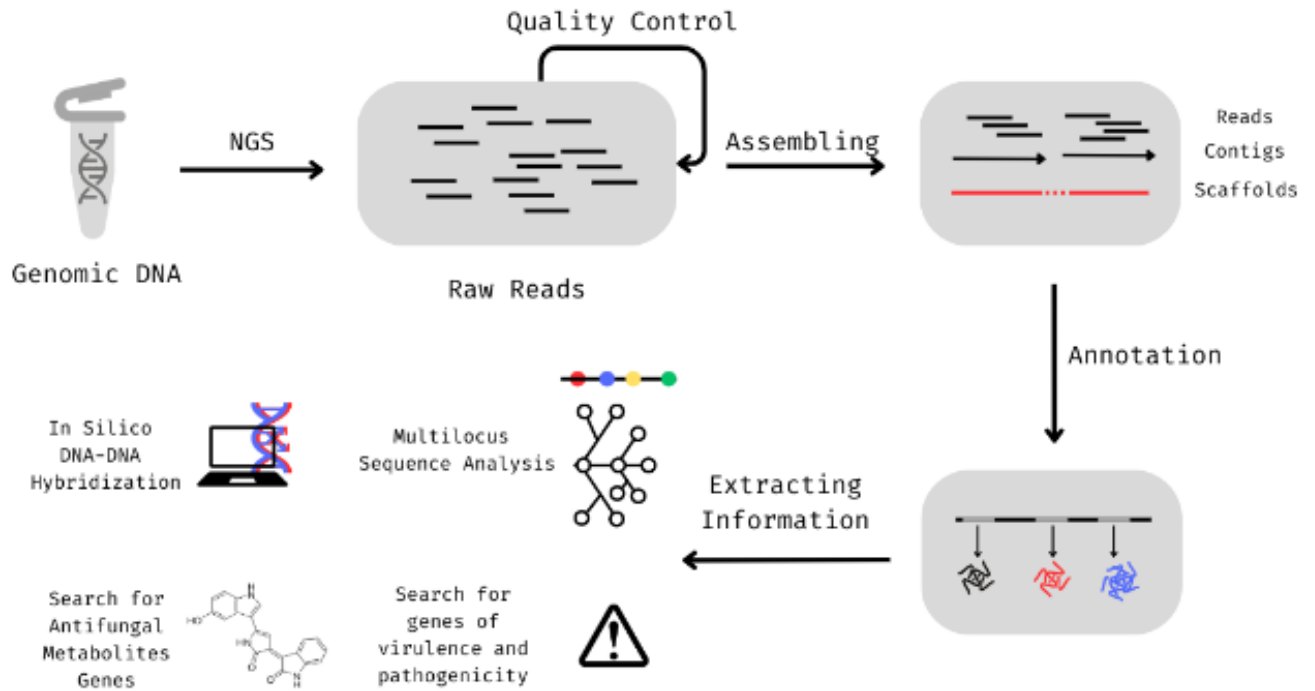
Fonte: Elaborado pelo autor. Esquema retratando a metodologia de antagonismo, com a disposição dos inóculos de colônias bacterianas nas extremidades da placa de Petri com o fungo crescendo a partir do centro.

4.5 Montagem e análise do genoma

O DNA genômico da linhagem *Pseudomonas* sp. B8 foi realizado através de um protocolo adaptado de termólise (SÁ et al., 2013). A cultura foi crescida em meio líquido TGE a 37 °C, por 24 h. Após isso, foi centrifugada a 5.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Os *pellets* celulares foram suspensos em água MilliQ estéril e aquecidos a 100 °C por 10 minutos em banho seco. Então, foram resfriados em -80 °C por 5 minutos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 5 minutos. Foi retirado uma alíquota do sobrenadante e transferido para outro *ependorf*. Posteriormente, as amostras foram quantificadas em um espectrofotômetro *Nanodrop* ND100, e submetidas à amplificação por PCR.

Com o DNA extraído, as sequências de DNA da cepa de *Pseudomonas* sp. B8 foi obtido a partir do sequenciamento *paired-end* (2 x 150bp) na plataforma Illumina Miseq. A qualidade e a quantidade das leituras foram avaliadas através no software FastQC v0.11.9, e foram cortadas pelo Trimmomatic v0.38, tomando os seguintes parâmetros: HEADCROP:20 SLIDINGWINDOW:4:15. Após isso, o genoma foi montado, através do SPAdes v3.13.1, e a contiguidade dos *scaffolds* formados foi avaliada pelo QUAST v5.2.0, além da completude dos genes ortólogos anotados a partir dos *scaffolds*, com o Busco v.5.4.6. Os dados referentes ao maior *scaffold* foram submetidos a um BLAST nucleotídeo-nucleotídeo, para se obter um direcionamento a respeito de seu gênero e espécie (DUARTE *et al.*, 2022). Para buscar genes de interesse, foi feita a anotação gênica utilizando o software Prokka v5.4.6. Fatores de virulência e patogenicidade foram buscados no ABRicate v1.0.1. Por fim, para identificar o gênero e a espécie, uma árvore filogenética foi feita a partir dos genes *gyrB*, *rpoB* e 16s rRNA, pelo método *Neighbour Joining* com modelo de substituição *Tamura-Nei* de distribuição discreta *gamma* (T92 + G) e *bootstrap* de 1000 replicações, sendo a cepa de *Escherichia coli* K-12 utilizada como grupo externo, além de hibridização DNA-DNA *in silico*, pelo método ANI – *Average Nucleotide Identity*, no site JSpeciesWS v3.9.8. Os principais representantes do gênero *Pseudomonas* utilizados para a construção da árvore filogenética foram: *P. putida*, *P. fluorescens*, *P. aeruginosa*, *P. syringae*, *P. stutzeri* (**Figura 4**).

Figura 4: Ilustração esquemática das etapas utilizadas para o estudo do genoma de *Pseudomonas* sp. B8, em inglês.



Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

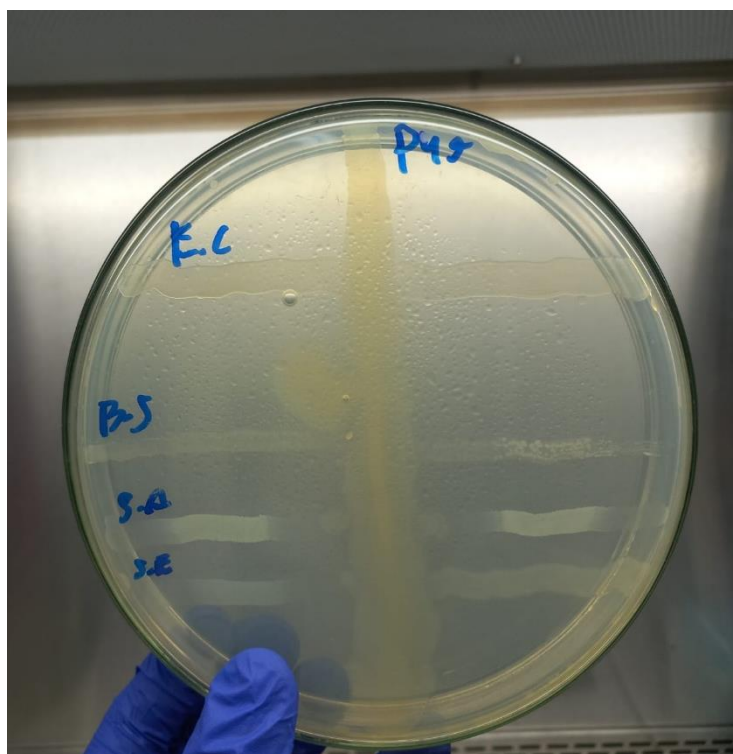
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Testes em meio sólido

O teste de antagonismo bacteriano em meio Ágar Mueller-Hinton foi avaliado após 24h e 48h. Em todos os testes realizados, P49 e P119 mostraram inibição das bactérias Gram positivas, *B. subtilis* e principalmente de *S. aureus*, ao passo que não inibiram as bactérias Gram negativas, *E. coli* e *S. enterica* (**Figuras 5 e 6**).

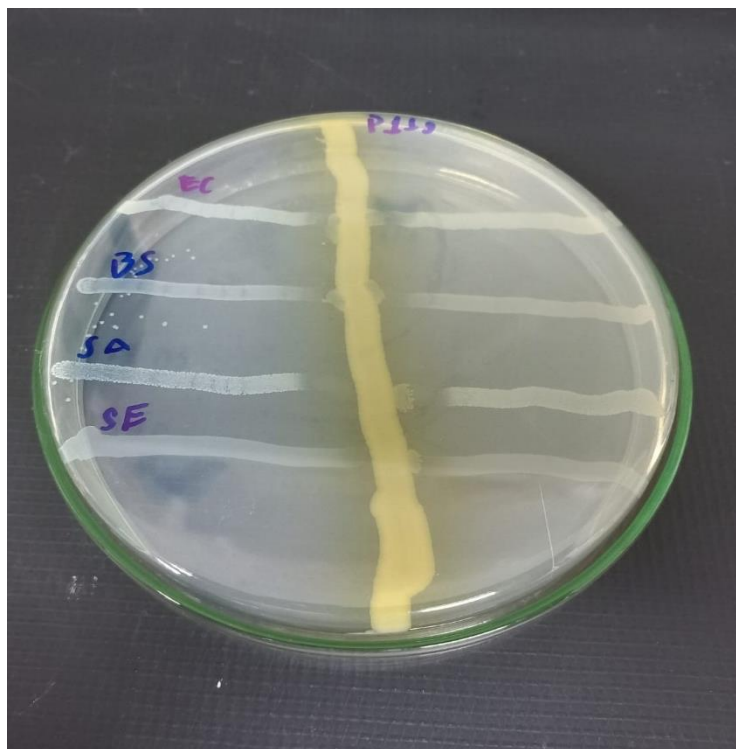
A linhagem *Pseudomonas* sp. P49 foi a que apresentou o melhor resultado. O crescimento de *S. aureus* foi observado e constatado que houve redução, e o de *B. subtilis* também, porém menos, o que indica a produção de um composto mais promissor para atuar contra o patógeno humano frequentemente resistente *S. aureus*.

Figura 5: Inibição das cepas bacterianas de teste pela linhagem de *Pseudomonas* sp. P49.



Fonte: Elaborado pelo autor. As estrias laterais que cessam seu crescimento próximo ao centro indicam inibição por parte da estria central. E.C = *Escherichia coli*; B.S = *Bacillus subtilis*; S.A = *Staphylococcus aureus*; S.E = *Salmonella enterica*.

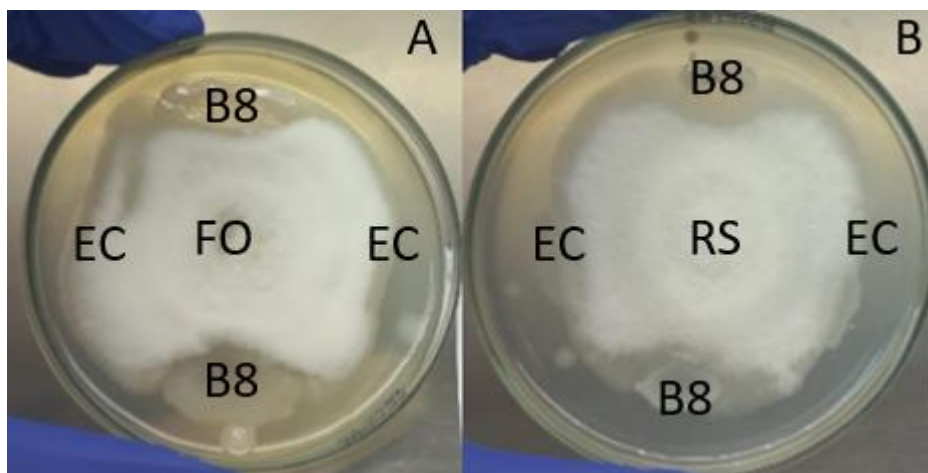
Figura 6: Inibição das cepas bacterianas de teste pela linhagem de *Pseudomonas* sp. P119.



Fonte: Elaborado pelo autor. As estrias laterais que cessam seu crescimento próximo ao centro indicam inibição por parte da estria central. E.C = *Escherichia coli*; B.S = *Bacillus subtilis*; S.A = *Staphylococcus aureus*; S.E = *Salmonella enterica*.

O teste de atividade antifúngica foi avaliado durante sete dias, todavia, após dois dias do inóculo das bactérias, já foi possível visualizar a inibição do crescimento fúngico. Tanto *R. solani* quanto *F. oxysporum* sofreram inibição por *Pseudomonas* sp. B8. Nenhuma das outras cepas mostraram potencial antifúngico, uma vez que as hifas aéreas cresceram normalmente por cima das colônias bacterianas após alguns dias. Nas placas inoculadas com *Pseudomonas* sp. B8, as colônias cresceram até entrar em contato com a extremidade do crescimento dos fungos, que posteriormente não era mais visível, sugerindo que houve inibição por parte dessa cepa (**Figura 7**).

Figura 7: Inibição dos fungos *F. oxysporum* e *R. solani* por *Pseudomonas* sp. B8, utilizando *E. coli* como controle negativo.



Fonte: Elaborado pelo autor. (A) FO = *Fusarium oxysporum*; EC = *E. coli*. (B) RS = *Rhizoctonia solani*; EC = *E. coli*.

A atividade antimicrobiana de *Pseudomonas* spp. é bastante relatada na literatura científica. Esse gênero é capaz de produzir inúmeros compostos antimicrobianos, muito utilizados na medicina e na agricultura. A mupirocina, citada anteriormente, foi descoberto há cerca de 40 anos numa cepa de *Pseudomonas fluorescens* e é extremamente eficiente contra as bactérias patogênicas dos gêneros *Staphylococcus* ou *Streptococcus*, notavelmente *S. aureus*. Esse antibiótico é muito utilizado para tratar infecções de pele causadas por essa bactéria (TUCALIUC *et al.*, 2019), e existe a possibilidade desse composto ser produzido por essas cepas testadas.

A mupirocina pode ser considerada um antibiótico direcionado, visto que apresenta atividade muito baixa contra a maioria das bactérias, tanto Gram negativas quanto Gram positivas. Por conta dessa especificidade de inibição, a chance desse ácido gerar uma resistência cruzada em outros tipos de bactéria é muito baixa (WARD; CAMPOLI-RICHARDS, 1986), e é um antibiótico de metabolismo sistêmico rápido, por isso é mais indicado para tratamento tópico, através de pomadas. Esse composto é utilizado, em alguns casos, para o tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), uma das bactérias hospitalares resistentes mais comuns. Contudo, existem também cepas de *S. aureus* resistentes à mupirocina, portanto, obter uma variedade de antibióticos que atuam de diferentes maneiras é sempre desejável (PATEL; GORWITZ; JERNIGAN, 2009).

Bactérias do grupo *Pseudomonas* também são capazes de produzir uma grande variedade de compostos de atividade antifúngica interessantes para a agricultura. Compostos

derivados da fenazina, como o ácido fenazina-1-carboxílico ou a 2-hidroxifenazina, além da forma pura desse composto, são utilizados para o controle biológico de espécies vegetais infectadas por fungos, e alguns compostos atuam na promoção do crescimento do tecido radicular. Felizmente, *Pseudomonas* são encontradas em abundância em todo o mundo, em amostras de solo e água, além da rizosfera de inúmeras culturas vegetais agricultáveis (CHIN-A-WOENG; BLOEMBERG; LUGTENBERG, 2003).

Essas bactérias promovem o crescimento vegetal e são capazes de fixar nitrogênio, solubilizar fosfato, além de produzir compostos como sideróforos e o ácido indol-3-acético. Cepas de *Pseudomonas* são muito abundantes dentre esse grupo, e as PGPR frequentemente atuam na proteção de espécies vegetais contra fungos patogênicos (BHARUCHA; PATEL; TRIVEDI, 2013). Dessa forma, *Pseudomonas*, ao lado de outros gêneros relevantes, como *Serratia* e *Bacillus*, ocupam essas funções no ambiente. Curiosamente, esses gêneros bacterianos também são encontrados em alguns ninhos de espumas de rãs encontrados no Ceará. (MONTEIRO *et al.*, 2023; MOUSTAINE *et al.*, 2017.)

Dessa forma, a microbiota dos ninhos de espumas se mostra rica em gêneros bacterianos de grande importância ecológica e potencial biotecnológico. Isso elucidada mais sobre a ecologia dos ninhos de espumas, principalmente sobre sua interação possivelmente benéfica com o ambiente em que é depositado, além de reforçar a importância dessa microbiota na proteção dos ovos e girinos contra patógenos.

Apesar disso, a manipulação de bactérias *Pseudomonas* não identificadas deve ser feita de maneira consciente e cautelosa, visto que muitas cepas podem ser patogênicas oportunistas para humanos e animais, como *Pseudomonas aeruginosa*. Essa espécie é frequente em ambiente hospitalar, e pode apresentar resistência incomum a antibióticos, assim como *S. aureus*. Também existem espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas*, como algumas cepas de *Pseudomonas syringae* (THI; WIBOWO; REHM, 2020; KLOTZ; HUTCHESON, 1992).

5.2 Identificação da cepa B8 e busca por genes de interesse.

Após a filtragem das sequências pelos parâmetros HEADCROP:20 e SLIDINGWINDOW 4:15, sobraram 82% das se considerando uma qualidade geral não muito boa. Ainda assim, as sequências com melhor qualidade foram trabalhadas, a fim de se extrair o máximo possível de informação (**Figuras 8, 9, 10 e 11**).

Figura 8: Relatório da quantidade de sequências brutas.

Measure	Value
Filename	B8_S3_L001_R1_001.fastq.gz
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	859091
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	35-151
%GC	64


Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

Figura 9: Relatório da quantidade de sequências após sua filtragem.

Measure	Value
Filename	R1_pf.fastq
File type	Conventional base calls
Encoding	Sanger / Illumina 1.9
Total Sequences	704788
Sequences flagged as poor quality	0
Sequence length	50-131
%GC	62

Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

Figura 10: Relatório da qualidade geral dos dados após a montagem do genoma.

Statistics without reference  scaffolds	
# contigs	226
# contigs (>= 0 bp)	631
# contigs (>= 1000 bp)	195
# contigs (>= 5000 bp)	159
# contigs (>= 10000 bp)	127
# contigs (>= 25000 bp)	86
# contigs (>= 50000 bp)	47
Largest contig	158 886
Total length	6 156 165
Total length (>= 0 bp)	6 208 243
Total length (>= 1000 bp)	6 132 883
Total length (>= 5000 bp)	6 028 414
Total length (>= 10000 bp)	5 791 754
Total length (>= 25000 bp)	5 115 114
Total length (>= 50000 bp)	3 690 489
N50	56 076
N90	15 253
auN	62 951
L50	36
L90	108
GC (%)	62.8
Mismatches	
# N's per 100 kbp	49.69
# N's	3059

Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

Figura 11: Dados estatísticos da montagem do genoma de *Pseudomonas* sp. B8

Nº de leituras	Total pares de base (pb)	Comprimento das leituras (pb)			
1409576	258123561	50-131			
Estatísticas da montagem					
<i>Nº de scaffolds (>500pb)</i>	<i>Tamanho total da montagem (pb)</i>	<i>Scaffold L50</i>	<i>Scaffold N50 (pb)</i>	<i>Conteúdo GC (%)</i>	
226	6156165	36°	56076	62.8	
Estatísticas da anotação					
<i>Nº de genes</i>	<i>Nº rRNA</i>	<i>Nº tRNA</i>	<i>Nº tmRNA</i>		
5594	5	59	1		

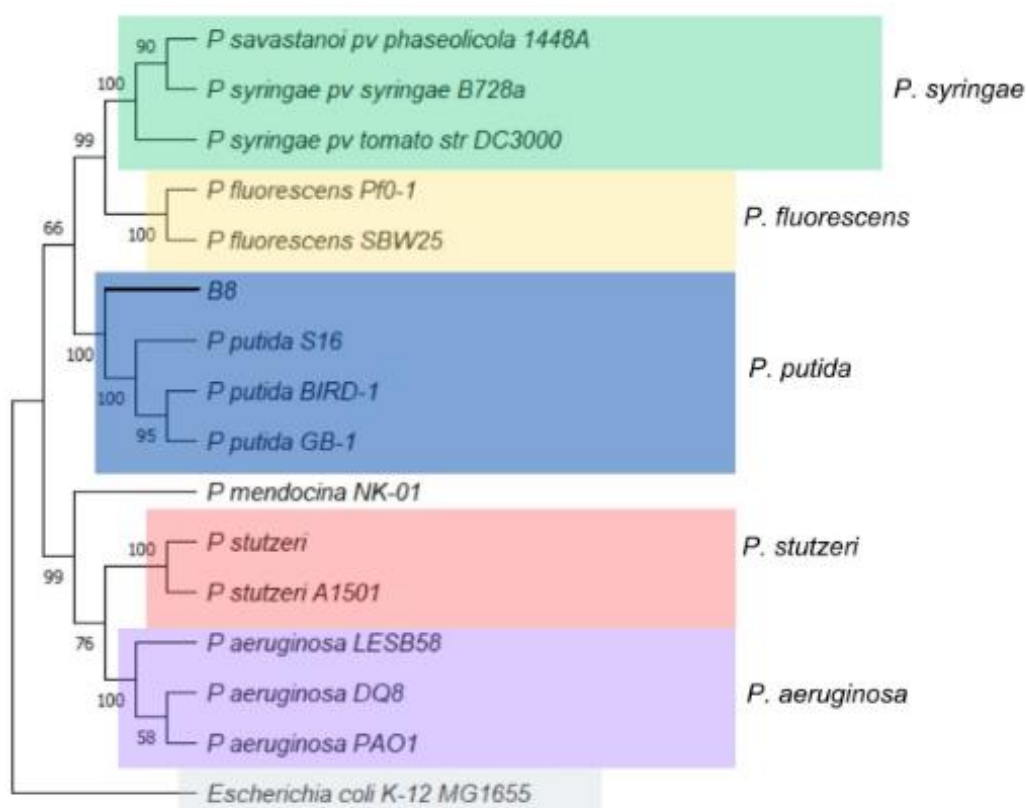
Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

A cepa B8 havia sido previamente submetida ao sequenciamento do gene 16S, mas os resultados obtidos não foram totalmente esclarecedores a respeito de seu gênero, havia apenas um indício de que essa cepa se tratava de uma *Pseudomonas*. Através da montagem de seu genoma e hibridização DNA:DNA *in silico*, confirmou-se que a linhagem B8 pertence ao gênero *Pseudomonas*, e não houve correspondência alta com os grupos patogênicos *P.*

aeruginosa e *P. syringae*. Os dados referentes ao maior scaffold obtidos na montagem foram submetidos a um BLAST nucleotídeo-nucleotídeo. O resultado mostrou uma proximidade com o genoma completo de uma cepa de *Pseudomonas putida*.

Para a identificação a nível de espécie, os genes “housekeeping” *rpoB*, 16S rDNA e *gyrB* foram utilizados para a construção de uma árvore filogenética com os principais representantes do gênero *Pseudomonas*, em que as sequências da linhagem B8 agruparam-se com as sequências de *P. putida* (**Figura 12**).

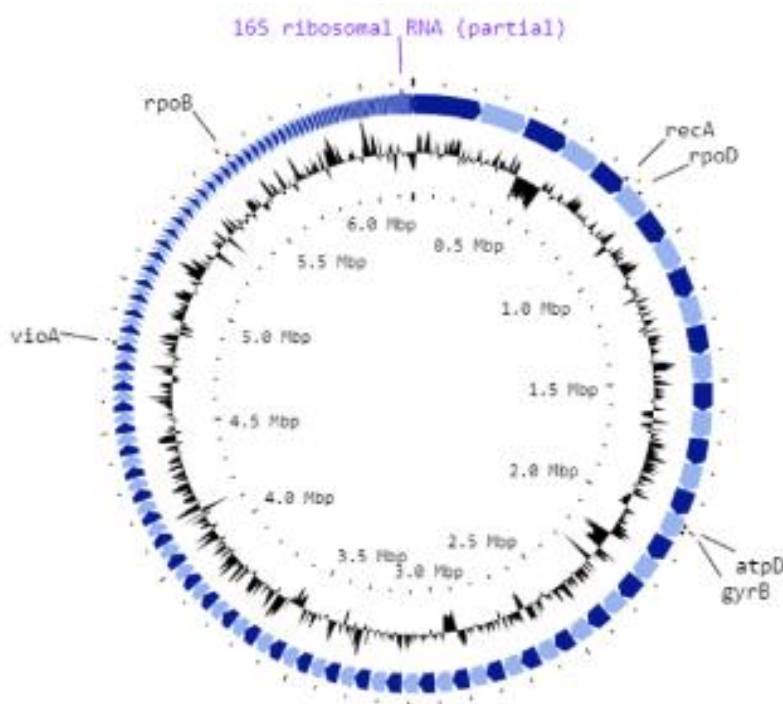
Figura 12: Árvore filogenética de *Pseudomonas* sp. B8 montada com os genes *housekeeping*.



Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

Por fim, os *contigs* foram ordenados de maior para menor e os principais genes foram anotados (**Figura 13**). Além disso, não foram encontrados genes relacionados à virulência ou patogenicidade nas sequências obtidas após tratamento de filtragem, o que ressalta seu potencial de aplicação para soluções biotecnológicas.

Figura 13: Contigs de *Pseudomonas* sp. B8 ordenados do menor para o maior, com genes de interesse anotados.



Fonte: Elaborado pelo autor e Matheus Henrique.

O grupo *P. putida* é conhecido por possuir espécies não patogênicas, capazes de degradar compostos tóxicos, como nicotina, além da produção de bioplásticos, como os polihidroxialcanoatos (LOESCHCKE; THIES, 2015; POBLETE-CASTRO *et al.*, 2012). Esse resultado positivo motiva ainda mais a continuidade dos estudos a respeito da *Pseudomonas* sp. B8, visto que, além do potencial antifúngico mostrado em meio sólido, ainda pode ser uma bactéria extremamente benéfica ao meio-ambiente e com aplicações industriais sustentáveis.

Apesar desse grupo ser relatado como não patogênico, são relatados casos de infecções oportunistas por bactérias desse grupo. Todas essas infecções foram de caráter nosocomial, em pacientes majoritariamente debilitados, e a maioria das cepas não mostraram resistência anormal aos antibióticos utilizados no tratamento (FERNÁNDEZ *et al.*, 2015). Porém, não encontramos genes relacionados a virulência ou patogenicidade nas sequências de *Pseudomonas* sp. B8

Entretanto, também não foram encontrados genes essenciais nas vias metabólicas de antifúngicos mais conhecidos produzidos por esse gênero, como violaceína ou fenazina. Apesar disso, sua atividade antifúngica foi observada nos testes em meio sólido. Provavelmente, os genes antifúngicos de interesse não foram encontrados ou devido à baixa qualidade geral das sequências, ou a linhagem *Pseudomonas* sp. B8 produz um composto antifúngico diferente dos

principais que foram procurados. Ademais, ainda que fossem encontrados genes envolvidos na produção de compostos antifúngicos, não necessariamente eles seriam produzidos, visto que algumas vezes os genes são ativados apenas em determinados contextos, tais como, um meio de cultura com nutrientes específicos, pH ou temperatura adequados, umidade, presença de ferro ou enxofre, entre outros (CHEN et al., 2011).

6 CONCLUSÃO

As bactérias *Pseudomonas* sp. P49 e P119, isoladas a partir de ninhos de espumas da rã *Phyllasaemus cuvieri* do estado do Ceará mostraram potencial antimicrobiano frente ao agente patogênico *Staphylococcus aureus*. A bactéria *Pseudomonas* sp. B8, isolada do ninho de espumas da rã *Adenomera hylaedactyla* mostrou potencial de inibição do crescimento dos fungos *Rhizoctonia solani* e *Fusarium oxysporum*. Essa cepa foi identificada como *Pseudomonas putida* e não apresentou genes relativos à patogenicidade e virulência, através da montagem e análise de seu genoma. Esse estudo abre perspectivas futuras promissoras para a continuidade do estudo da microbiota de ninhos de espumas no combate a patógenos, assim como ajuda a entender suas funções ecológicas.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, M.; IENES-LIMA, J. Anurans against SARS-CoV-2: A review of the potential antiviral action of anurans cutaneous peptides. *Virus Research*, v. 315, p. 198769, jul. 2022.
- ARZABE, C. Reproductive activity patterns of anurans in two different altitudinal sites within the Brazilian Caatinga. *Revista Brasileira de Zoologia*, v. 16, n. 3, p. 851–864, 1999.
- BATABYAL, B.; KUNDU, G.; BISWAS, S. Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus*: A Brief Review. *International Research Journal of Biological Sciences*, v. 1, n. 7, p. 65–71, 2012.
- BHARUCHA, U.; PATEL, K.; TRIVEDI, U. B. Optimization of Indole Acetic Acid Production by *Pseudomonas putida* UB1 and its Effect as Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on Mustard (*Brassica nigra*). *Agricultural Research*, v. 2, n. 3, p. 215–221, 22 jun. 2013.
- CASTRO, L. G. Z. DE. PROSPECÇÃO DE MICRORGANISMOS ISOLADOS DE NINHO CHAUHAN, A.; JINDAL, T. Biochemical and Molecular Methods for Bacterial Identification. *Microbiological Methods for Environment, Food and Pharmaceutical Analysis*, p. 425–468, 2020.
- CHEN, L. et al. Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*, v. 234, n. 2, p. 377–390, 20 abr. 2011.
- CHIN-A-WOENG, T. F. C.; BLOEMBERG, G. V.; LUGTENBERG, B. J. J. Phenazines and their role in biocontrol by *Pseudomonas* bacteria. *New Phytologist*, v. 157, n. 3, p. 503–523, mar. 2003.
- CUI, X. *et al.* Development and research progress of anti-drug resistant fungal drugs. *Journal of Infection and Public Health*, v. 15, n. 9, p. 986–1000, set. 2022.
- D'AURIA, F. D. *et al.* Antifungal Activity of the Frog Skin Peptide Temporin G and Its Effect on *Candida albicans* Virulence Factors. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 23, n. 11, p. 6345, 6 jun. 2022.
- DAISLEY *et al.* Deteriorating microbiomes in agriculture - the unintended effects of pesticides on microbial life. *Microbiome Research Reports*, v. 1, n. 1, p. 6, 25 jan. 2022.
- DALGETTY, L., & KENNEDY, M. W. (2010). Building a home from foam-túngara frog foam nest architecture and three-phase construction process. *Biology Letters*, 6(3), 293– 296. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2009.0934>

DANQUAH, C. *et al.* Antimicrobial Compounds from Microorganisms. *Antibiotics*, v. 11, n. 3, p. 285, 22 fev. 2022.

DAVID, B. V.; CHANDRASEHAR, G.; SELVAM, P. N. Chapter 10 - *Pseudomonas fluorescens*: A Plant-Growth-Promoting Rhizobacterium (PGPR) With Potential Role in Biocontrol of Pests of Crops. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780444639875000104>>.

DE ESPUMA DE *Leptodactylus vastus* E *Physalaemus cuvieri* COM POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO, Monografia (Graduação em Biotecnologia) – Universidade Federal do Ceará, Ceará, 2019

DOLAN, S. K. *et al.* Contextual Flexibility in *Pseudomonas aeruginosa* Central Carbon Metabolism during Growth in Single Carbon Sources. *mBio*, v. 11, n. 2, 17 mar. 2020.

DUARTE, I.O *et al.* Genomic Analysis of Surfactant-Producing *Bacillus vallismortis* TIM68: First Glimpse at Species Pangenome and Prediction of New Plipastatin-Like Lipopeptide. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 195, n. 2, p. 753–771, 27 set. 2022.

FERNÁNDEZ, M. *et al.* Analysis of the pathogenic potential of nosocomial *Pseudomonas putida* strains. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 25 ago. 2015.

FISCHER, E. K. Form, function, foam: evolutionary ecology of anuran nests and nesting behaviour. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, v. 378, n. 1884, 10 jul. 2023.

FISHER, M. C. *et al.* Threats Posed by the Fungal Kingdom to Humans, Wildlife, and Agriculture. *mBio*, v. 11, n. 3, 5 maio 2020.

FISHER, M. C.; PASMANS, F.; MARTEL, A. Virulence and Pathogenicity of Chytrid Fungi Causing Amphibian Extinctions. *Annual Review of Microbiology*, v. 75, n. 1, p. 673–693, 8 out. 2021.

FLEMING, R. I. *et al.* Foam nest components of the túngara frog: a cocktail of proteins conferring physical and biological resilience. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 276, n. 1663, p. 1787–1795, 25 fev. 2009.

GILANI, R. A. *et al.* Biodegradation of chlorpyrifos by bacterial genus *Pseudomonas*. *Journal of Basic Microbiology*, v. 56, n. 2, p. 105–119, 24 nov. 2015.

HERNÁNDEZ-LEÓN, R. *et al.* Characterization of the antifungal and plant growth-promoting effects of diffusible and volatile organic compounds produced by *Pseudomonas fluorescens* strains. *Biological Control*, v. 81, p. 83–92, fev. 2015.

HISSA, D. C. *et al.* Frog Foam Nest Protein Diversity and Synthesis. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology*, v. 325, n. 7, p. 425–433, 2016

HISSA, D. C. *et al.* Novel surfactant proteins are involved in the structure and stability of foam nests from the frog *Leptodactylus vastus*. *Journal of Experimental Biology*, v. 211, n. 16, p. 2707–2711, 2008.

HOCKING, D.; BABBITT, K. Amphibian Contributions to Ecosystem Services. *Herpetological Conservation and Biology*, 13 jul. 2014.

HOPKINS, W. A. Amphibians as Models for Studying Environmental Change. *ILAR Journal*, v. 48, n. 3, p. 270–277, 1 jan. 2007.

KLOTZ, M. G.; HUTCHESON, S. W. Multiple periplasmic catalases in phytopathogenic strains of *Pseudomonas syringae*. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 58, n. 8, p. 2468–2473, 1 ago. 1992.

L. COHEN, F.; TARTASKY, D. Microbial resistance to drug therapy: A review. *American Journal of Infection Control*, v. 25, n. 1, p. 51–64, fev. 1997.

LOESCHCKE, A.; THIES, S. *Pseudomonas putida*—a versatile host for the production of natural products. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 99, n. 15, p. 6197–6214, 2015.

MARTINS, D. V. ESTUDO DA COMPOSIÇÃO E DAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS DO NINHO DE ESPUMA DO ANURO

MATTHIJS, S. *et al.* Antimicrobial properties of *Pseudomonas* strains producing the antibiotic mupirocin. *Research in Microbiology*, v. 165, n. 8, p. 695–704, 1 out. 2014.

MCGRATH-BLASER, S. *et al.* Early life skin microbial trajectory as a function of vertical and environmental transmission in Bornean foam-nesting frogs. *Animal Microbiome*, v. 3, n. 1, dez. 2021.

MÉNDEZ-NARVÁEZ, J.; FLECHAS, S. V.; AMÉZQUITA, A. Foam Nests Provide Context-Dependent Thermal Insulation to Embryos of Three *Leptodactylid* Frogs. *Physiological and Biochemical Zoology*, v. 88, n. 3, p. 246–253, 1 maio 2015.

MONTEIRO, F. A. C. *et al.* Neotropical Frog Foam Nest's Microbiomes. *Microorganisms*, v. 11, n. 4, p. 900, 1 abr. 2023.

MORIKAWA, N.; HAGIWARA, K.; NAKAJIMA, T. Brevinin-1 and -2, unique antimicrobial peptides from the skin of the frog, *Rana brevipoda* porsa. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 189, n. 1, p. 184–190, nov. 1992.

MOUSTAINE, M. *et al.* Effect of plant growth promoting rhizobacterial (PGPR) inoculation on growth in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) and characterization for direct PGP abilities in Morocco. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, v. 2, n. 2, p. 590–596, 2017.

MULET, M. *et al.* An *rpoD*-based PCR procedure for the identification of *Pseudomonas* species and for their detection in environmental samples. *Molecular and Cellular Probes*, v. 23, n. 3, p. 140–147, 1 jun. 2009.

NAVAS, C. A.; ANTONIAZZI, M. M.; JARED, C. A preliminary assessment of anuran physiological and morphological adaptation to the Caatinga, a Brazilian semi-arid environment. *International Congress Series*, v. 1275, p. 298–305, dez. 2004.

NUCCI, M.; ANAISSIE, E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 20, n. 4, p. 695–704, 1 out. 2007.

OTEINO, N. *et al.* Plant growth promotion induced by phosphate solubilizing endophytic *Pseudomonas* isolates. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, 22 jul. 2015.

PATEL, JEAN B.; GORWITZ, RACHEL J.; JERNIGAN, JOHN A. Mupirocin Resistance. *Clinical Infectious Diseases*, v. 49, n. 6, p. 935–941, 15 set. 2009.

POBLETE-CASTRO, I. *et al.* Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida* and related species. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 93, n. 6, p. 2279–2290, 18 fev. 2012.

RAASCH-FERNANDES, L. D. *et al.* In vitro antimicrobial activity of methanolic extracts from cutaneous secretions of Amazonian amphibians against phytopathogens of agricultural interest. *Acta Amazonica*, v. 51, p. 145–155, 17 maio 2021.

VIEIRA, W. L.; SANTANA, G. G.; ARZABE, C. Diversity of reproductive modes in anurans communities in the Caatinga (dryland) of northeastern Brazil. *Biodiversity and Conservation*, v. 18, n. 1, p. 55–66, 11 jul. 2008.

RAIGER, L. J. *et al.* Genome sequence analysis of *Pseudomonas extremaustralis* provides new insights into environmental adaptability and extreme conditions resistance. *Extremophiles*, v. 19, n. 1, p. 207–220, 15 out. 2014.

RAMETTE, A. *et al.* *Pseudomonas protegens* sp. nov., widespread plant-protecting bacteria producing the biocontrol compounds 2,4-diacetylphloroglucinol and pyoluteorin. *Systematic and Applied Microbiology*, v. 34, n. 3, p. 180–188, maio 2011.

RANI, L. *et al.* An extensive review on the consequences of chemical pesticides on human health and environment. *Journal of Cleaner Production*, v. 283, p. 124657, 14 out. 2020.

REIS, A.; BOITEUX, L. S. Outbreak of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in commercial fresh-market tomato fields in Rio de Janeiro State, Brazil. *Horticultura Brasileira*, v. 25, n. 3, p. 451–454, set. 2007.

RODRÍGUEZ, C. *et al.* Toxins and pharmacologically active compounds from species of the family Bufonidae (Amphibia, Anura). *Journal of Ethnopharmacology*, v. 198, p. 235–254, fev. 2017.

SÁ, et al. Distribution of PLD and FagA, B, C and D genes in *Corynebacterium pseudotuberculosis* isolates from sheep and goats with caseus lymphadenitis. **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 2, p. 265–268, 2013.

SHAHNURDIN, S., ISMAIL, M. N., KWAN, S. H., & NAJIMUDIN, N. (2017). Ecology and protein composition of polypedates leucomystax (Gravenhorst, 1829) (Anura: Rhacophoridae) foam nests from Peninsular Malaysia. *Annual Research and Review in Biology*, 14(6), 1–10. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2017/34211>

SOUOMOY, L. *et al.* Bufalin for an innovative therapeutic approach against cancer. *Pharmacological Research*, v. 184, p. 106442, out. 2022.

SRIVASTAV, A. L. Chapter 6 - Chemical fertilizers and pesticides: role in groundwater contamination. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/B9780081030172000064>>.

SUÁREZ-ESTRELLA, F. *et al.* Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*. *Crop Protection*, v. 26, n. 1, p. 46–53, jan. 2007.

SUHANA, S.; NUTAN, Y.; ANOOP R., M. Interactive potential of *Pseudomonas* species with plants. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 25 nov. 2020.

TAN, G. *et al.* Risk factors and antimicrobial resistance profiles of *Pseudomonas putida* infection in Central China, 2010–2017. *Medicine*, v. 98, n. 44, p. e17812, 1 nov. 2019.

THI, M. T. T.; WIBOWO, D.; REHM, B. H. A. *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, n. 22, p. 8671, 17 nov. 2020.

TUCALIUC, A. *et al.* Mupirocin: applications and production. *Biotechnology Letters*, v. 41, n. 4-5, p. 495–502, 29 mar. 2019.

WALSH, U. F.; MORRISSEY, J. P.; O’GARA, F. *Pseudomonas* for biocontrol of phytopathogens: from functional genomics to commercial exploitation. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 12, n. 3, p. 289–295, jun. 2001.

WEIMER, A. *et al.* Industrial biotechnology of *Pseudomonas putida*: advances and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 104, n. 18, p. 7745–7766, 13 ago. 2020.

WELLS, K. (2007). *The Ecology & Behavior of Amphibians*. Bibliovault OAI Repository, the University of Chicago Press. 10.7208/chicago/9780226893334.001.0001.

ZAGHLOUL, A. *et al.* Biological indicators for pollution detection in terrestrial and aquatic ecosystems. *Bulletin of the National Research Centre*, v. 44, n. 1, 28 jul. 2020.

ZHAO, B. G.; LIN, F. Mutualistic symbiosis between *Bursaphelenchus xylophilus* and bacteria of the genus *Pseudomonas*. *Forest Pathology*, v. 35, n. 5, p. 339–345, out. 2005.